

## カキ・グリコーゲンの酵素消化について

松井元子<sup>1)</sup>・角田万里子<sup>2)</sup>・三崎 旭<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>大阪市大生活科学部\*, (<sup>2)</sup>甲南女大家政\*\*)

### Enzymic Digestions of Oyster Glycogen

Motoko MATSUI<sup>1)</sup>, Mariko KAKUTA<sup>2)</sup> and Akira MISAKI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Food and Nutrition, Osaka City University, and <sup>2)</sup>Konan Womens University

In a series of studies on oyster glycogen, we elucidated its detailed structural features. In the nutritional view, the present investigation has been concerned with the enzymic degradation of the highly branched glycogen in the digestive tracts, compared with the case of starch.

The purified glycogen and amylopectin (waxy maize starch) were degraded by salivary  $\alpha$ -amylase (human: crystallized), giving  $\alpha$ -amylolysis limit, 48.3% and 57.8%, respectively.

The maltosaccharides produced by the amylase action were fractionated by HPAEC (Dionex), and each branched oligosaccharide collected from the column was characterized by analysis of the saccharides released by action with  $\alpha$ -glucosidase, isomaltase or pullulanase. In this way, the following branched oligosaccharides were identified: 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -glucosyl-maltotriose and -maltotetraose, 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -maltosyl-maltotriose and -maltotetraose, 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -maltotriosyl-maltotriose and -maltotetraose, in addition to several unidentified branched maltosaccharides. These branched dextrans, compared with those in amylopectin, supporting multiply branched structure of the glycogen.

Following the salivary amylolysis, glycogen was further degraded by pancreatic  $\alpha$ -amylase (hog: crystallized), and finally by rat intestinal glucosidases (acetone powder; Sigma Co.), and on each step the released oligosaccharides were analyzed by HPAEC. The results showed that by successive actions with salivary and pancreatic amylase the oyster glycogen was gradually hydrolyzed to give mainly maltose and branched  $\alpha$ -limit dextrans. Although these oligosaccharides were finally hydrolyzed to glucose by intestinal  $\alpha$ -glucosidases (hydrolysis, 86% as glucose), small amounts of multiply branched oligosacchar-

---

\*所在地：大阪市住吉区杉本3-3-138 (〒558)

\*\*所在地：神戸市東灘区森北町6-2-23 (〒658)

ides might still remain as the glucosidase-resistant forms.

先に我々は、HPAEC を用いてカキおよび他の貝類のグリコーゲンの詳細な鎖長分布を比較し、さらにカキについて季節に伴う鎖長分布の変動について報告した<sup>1)</sup>。

現在、広島産カキ (1992年1月収穫) より DMSO 抽出したグリコーゲンの構造を酵素分解を中心に新しい方法で詳細に検討している。本研究に用いたグリコーゲンは最近の我々の研究で基本的には“Meyer”の構造モデルに近いが、A : B-chain = 0.7 : 1 で、 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) unit chain が 4 ~ 5 段階分岐した多分岐構造をもつことが明らかになった。(Fig. 1)<sup>2,3)</sup>

本研究ではカキの栄養食品としての利用の観点から、グリコーゲンを  $\alpha$ -アミラーゼで分解した際の消化性を調べた。 $\alpha$ -アミラーゼはグリコーゲンや澱粉の内部鎖の  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を切断するが、分岐点である  $\alpha$ -1,6 結合やその近傍の  $\alpha$ -1,4 結合は切断できない。そこで種々の分岐オリゴ糖が生成される。貝沼らはこれらの重合度の異なる分岐オリゴ糖を活性炭 Celite カラムおよび調製用ペーパークロマトグラフィーにより分離・精製し、さらに種々の酵素を異なった順序・組合せで作用させ、2次元クロマトグラフィーにより、オリゴ糖の構造を決定している<sup>4)</sup>。我々は最近開発された陰イオン交換カラムの液体クロマトグラフィー (HPAEC)<sup>1)</sup>を用いて  $\alpha$ -リミット・デキストリン中の分岐オリゴ糖の構造を決定し、グリコーゲンの分岐パターンを調べ、さらに酵素消化性について、アミロペクチンと比較検討した。

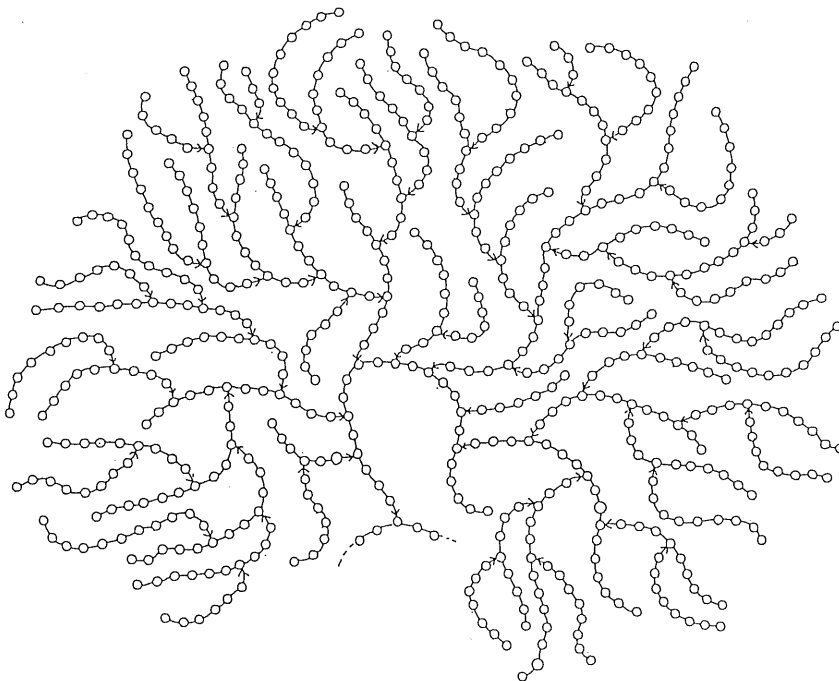


Fig. 1 Proposed structure of oyster glycogen ○, glucose unit; —,  $\alpha$ -1,4-link.; ↓,  $\alpha$ -1,6-link.

## 材料と方法

### 1) 実験材料

1991年2月、広島湾で採集された新鮮なカキより調製されたグリコーゲン(糖量98.5%, 蛋白量1.6%, 分子量 $8 \sim 15 \times 10^5$ , 平均鎖長11 (methylation))<sup>2)</sup>を用い比較としてモチトウモロコシ・デンプン(アミロペクチン)も用いた。

### 2) 酵素反応

*In vitro*における消化実験には、ヒト唾液アミラーゼ(Sigma社製)、ブタ膵液アミラーゼ(Sigma社製)、小腸粘膜酵素としてラット小腸アセトン粉末(Sigma社製)を用いた。試料を5mMのリン酸緩衝液(PBS, pH6.5)に溶解して37°Cに保ち酵素を24時間反応させた。反応停止液はSomogyi-Nelson法<sup>5)</sup>により還元糖を測定しさらに脱塩(AG501-X8, Bio Rad)後HPAECで分離分画した。

それぞれの画分を集め、各々にプルラーゼ(*Klebsiella*, 林原生化研製)、イソマルターゼ(Bakers Yeast, Sigma社製)、 $\alpha$ -D-グルコシダーゼ(生化学工業製)を作用させ、さらにHPAECで分離分画することにより種々の分岐オリゴ糖を分離同定した。

### 3) HPAEC (High performance anion exchange chromatography)

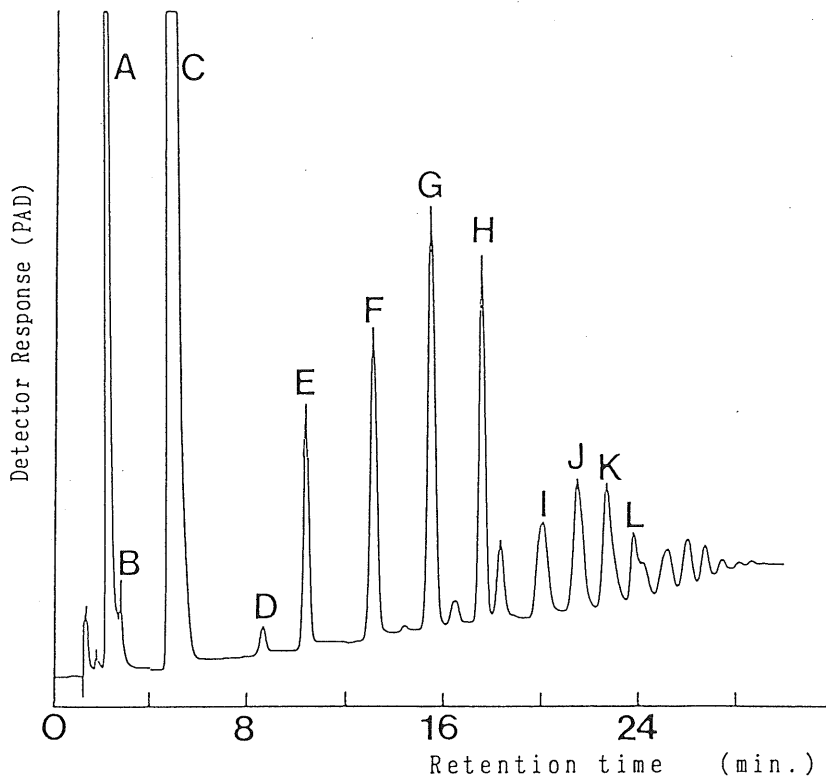
HPAECはDIONEX社製のBioLC MODEL 4500Iで、カラムはHPIC-AS6(250×4mmI.D.)とHPIC-AG6(50×4mmI.D.)のガードカラムを用いPulsed amperometric detectorで検出した。溶出条件は、0.15M NaOHと0.15M NaOH-M NaOAcのグラジュエントに依った。この陰イオンクロマトグラフィーでは単糖(DP1)から約35糖(DP35)まで完全に分離することができた<sup>1)</sup>。

## 結果と考察

カキ・グリコーゲンにヒト唾液アミラーゼを作用させ、HPAECにより種々のオリゴ糖を分離分画した結果をFig. 2に示した。分解率はSomogyi-Nelson法<sup>5)</sup>で測定しグルコースとして48.3%, アミロペクチンについても同様の処理をし分解率は57.8%であった。HPAECのPAD検出器から溶出してくるオリゴ糖は直ちに回収しFr.A~Fr.Lに分画した後、両イオン交換樹脂(AG501-X8, Bio Rad)で脱塩した。

それぞれの画分にプルラーゼ、イソマルターゼ、グルコシダーゼを各々作用させた結果をTable 1に示した。オリゴ糖のモル比はHPAEC値をmolar response<sup>6,7)</sup>で補正した値である。この結果よりFig. 3に示すように、Fr.Aはグルコース(G1), Fr.B(微量)はイソマルトース, Fr.Cはマルトース(G2), Fr.Dはマルトリオース(G3), Fr.Eは $6^3$ - $\alpha$ グリコシルマルトリオース(B<sub>4</sub>), Fr.Fは $6^3$ - $\alpha$ -グリコシルマルトテトラオース("fast" B<sub>5</sub>)と $6^3$ - $\alpha$ -マルトシルマルトリオース("slow" B<sub>5</sub>), Fr.Gは $6^3$ - $\alpha$ -マルトシルマルトテトラオース("2 on 4" B<sub>6</sub>)と $6^3$ - $\alpha$ -マルトリオシルマルトリオース("pullulan" B<sub>6</sub>), Fr.Hは $6^3$ - $\alpha$ -マルトリオシルマルトテトラオース("3 on 4" B<sub>7</sub>)となり、Fr.E~Hは $\alpha$ -1,6結合を1個含み、重合度4~7のオリゴ糖であった(single branched oligosaccharide)。

またFr.IからFr.Lは $\alpha$ -1,6結合を2個以上含む多分岐オリゴ糖(multiple branched oligosaccharide)



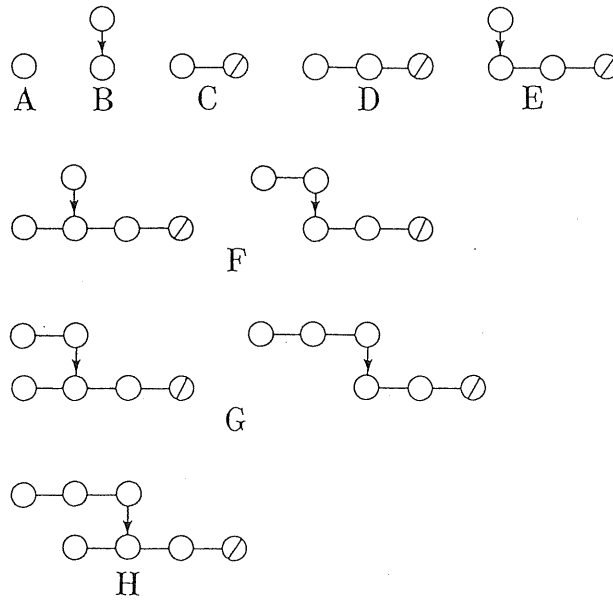
**Fig. 2** Elution profile of  $\alpha$ -amylase degradation products prepared from glycogen of oyster.

Chromatographic condition: column HPIC-AS6(250 $\times$ 4mmI.D.) eluent A, 150mM sodium hydroxide; eluent B, 150mM sodium hydroxide containing 1M sodium acetate; gradient program, 95% eluent A (5% eluent B) at 0 min. 55% eluent A (45% eluent B) at 40 min.; flow rate, 1ml/min.

**Table 1.** Oligosaccharides present in the  $\alpha$ -limit dextrin after salivary  $\alpha$ -amylolysis of oyster glycogen.

Peak	RT <sub>G</sub> *	Oligosaccharide	Hydrolysis products		
			glucosidase	isomaltase	pullulanase
Fr. A	1.0	glucose (G1)			
B	1.3	isomaltose (IM)			
C	2.2	maltose (G2)			
D	3.8	maltotriose (G3)			
E	4.6	B <sub>4</sub>		G2, IM	
F	5.6	"fast" B <sub>5</sub> , "slow" B <sub>5</sub>	G1, Fr. E (B <sub>4</sub> )		G2, G3 (1:1)
G	6.8	"2on4" B <sub>6</sub> , "pullulan" B <sub>6</sub>	G1, Fr. F		G2, G3, G4 (5:3:5)
H	7.8	"3on4" B <sub>7</sub>	G1, Fr. E, F		G3, G4 (1:1)
I	8.9	multiple branched			G2, G3, G4, G5 (3:4:2:0.3)
J	9.6	multiple branched			G2, G3, G4 (5:2:1)
K	10.1	multiple branched			G2, G3, G4, G6 (2:2:1:1)
L	10.6	multiple branched			G3, G4, G5, G6 (6:2:1:2)

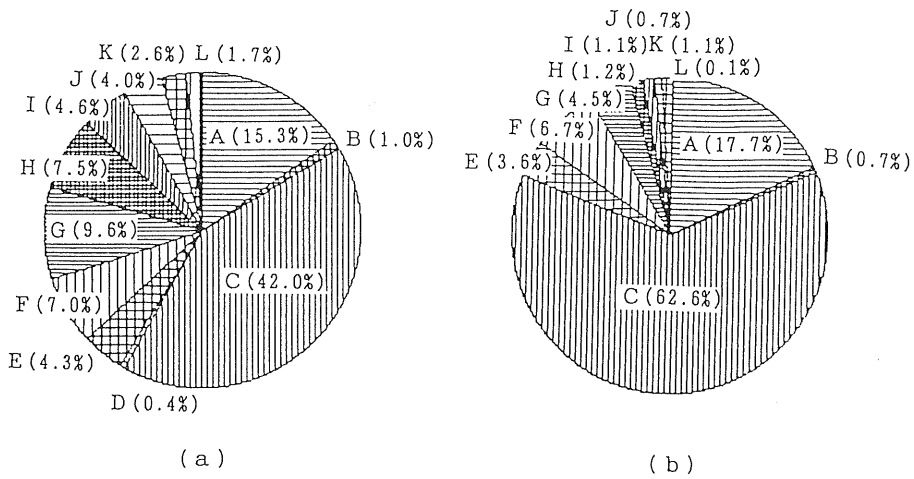
\*relative to the retention time of glucose(G1).



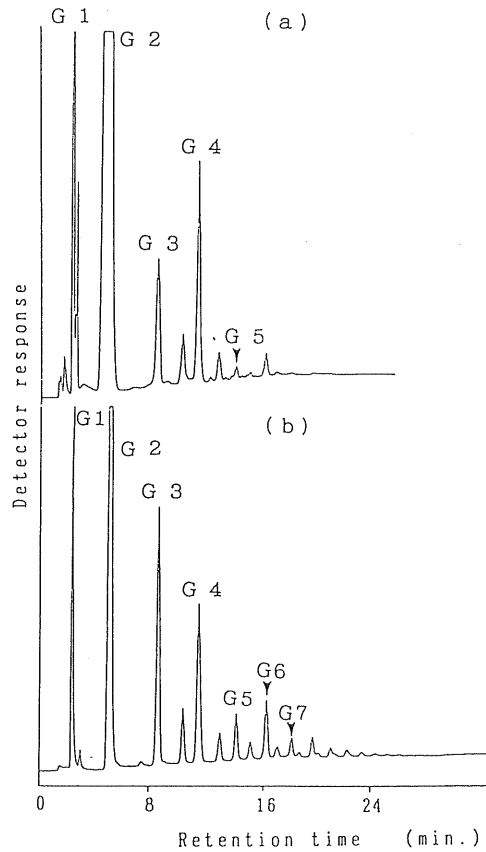
**Fig. 3** Structures of oligosaccharides in the  $\alpha$ -limit dextrins of glycogen after salivary  $\alpha$ -amylolysis.  
 O, glucose unit; O with slash, reducing-end glucose unit; —,  $\alpha$ -1,4-link; ↓,  $\alpha$ -1,6-link.

で重合度 8 以上の多分岐オリゴ糖であった。これらの構造は、貝沼と French により明らかにされたブタ膵臓アミラーゼ限界デキストリンの構造 (アミロペクチン)<sup>4)</sup> や梅木と山本らにより明らかにされた細菌糖化型アミラーゼにより構造決定された限界デキストリンの構造 (アミロペクチン) とよく似ている<sup>8)</sup>。

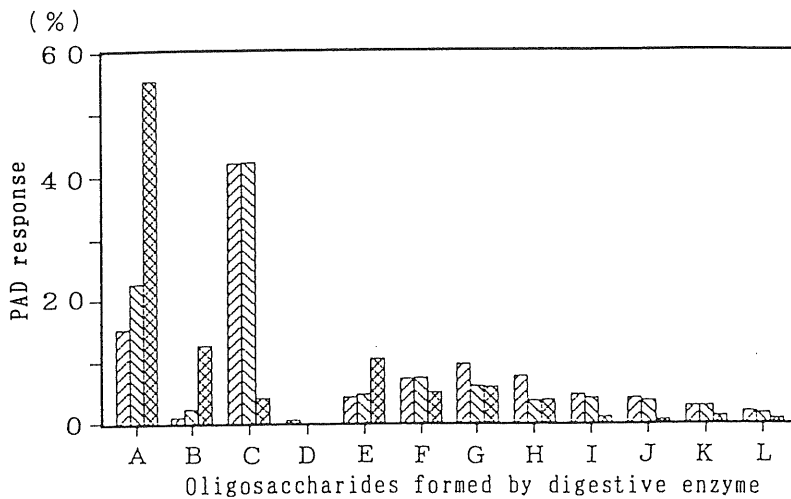
しかし、これらのオリゴ糖の分布割合については、Fig. 4 に示すようにグリコーゲンでは、アミロペクチンと比べマルトース (Fr.C) の占める割合は異なり、さらに single branched oligosaccharide (Fr.E ~ H) についてはグリコーゲンで 28.4% アミロペクチンで 16.0%、multiple branched oligosaccharide (Fr.I ~ L) では、グリコーゲンで 12.9% アミロペクチンで 3.0% と顕著な差がみられた。さらにグリコーゲンとアミロペクチンに  $\alpha$ -アミラーゼ (ヒト唾液) 作用させた後、さらにプルラーゼを作用させたときのオリゴ糖を HPAEC で分離分画した結果を Fig. 5 に示すが、マルトースの割合の差は顕著である。アミロペクチンの場合にはテトラオース (G4) の割合が多く single branched oligosaccharides が多く存在することを示唆するが、グリコーゲンの場合は、G5, G6, G7 が示すように multiple branched oligosaccharides の占める割合が多い。この結果はグリコーゲンは、高度に多重分岐した分子であり、アミロペクチンよりグリコーゲンの方が  $\alpha$ -アミラーゼで切断され難く、換言すれば内部鎖の分岐間距離が短いことが示唆された。次にカキ・グリコーゲンを摂取した時どこまで消化分離されるかを、*in vitro* で調べた。すなわち、グリコーゲンに唾液アミラーゼ (ヒト) を 24 時間作用させ、さらにその分解物に膵液アミラーゼ (ブタ) を作用 (24 時間) させ、続いて小腸粘膜酵素としてラット小腸アセトン粉末 (Sigma 社製) を作用させ、最終生成物を HPAEC 分析し、それらの割合を Fig. 6 に示した。グリ



**Fig. 4** Proportions of oligosaccharides in the  $\alpha$ -limit dextrin (salivary  $\alpha$ -amylolysis) from glycogen (a) and waxy maize starch (b). Structure, see Fig. 2



**Fig. 5** Comparison of elution profiles of  $\alpha$ -limit dextrins of waxy maize starch (a) and oyster glycogen (b) and after debranching by pullulanase action.



**Fig. 6** Distribution of oligosaccharides during successive enzymic degradations of oyster glycogen  
 a),  $\square$  salivary  $\alpha$ -amylase  
 b),  $\boxtimes$  pancreas  $\alpha$ -amylolysis of a)  
 c),  $\boxplus$  intestinal glycosidases (acetone powder) of b)  
 Structure of products (A~H), see Fig. 2

コーゲンは唾液アミラーゼ、膵液アミラーゼによりデキストリンに低分子化され、還元力が増加する。これらのオリゴ糖は小腸粘膜酵素である $\alpha$ -グルコシダーゼでさらに低分子化され、終末消化されてアミロペクチンと同様にグルコースになることが示された。最終的に分解率は86.0%であった。しかし、今回の実験ではそれぞれの酵素の反応時間を24時間としたが、実際の生体内では、酵素分解の時間は時間の逆数であり、それぞれの酵素の作用する時間を考慮した上で系統的に追跡する必要があると考えられる。

いずれにせよ、グリコーゲンの $\alpha$ -アミラーゼ分解物では多様な分岐オリゴ糖が生成されこの点では、アミロペクチンの分解と異なることから、グリコーゲンはアミロペクチンよりも徐々に低分子化され、必ずしも完全にグルコースにまで分解されずに、少量の分岐オリゴ糖を残すのではないかと考えられる。

## 文 献

- 1) 松井元子, 角田万里子, 三崎 旭 (1991) 微量栄養素研究 8 : 105
- 2) MATSUI, M., M. KAKUTA and A. MISAKI (1992) X Vth international carbohydrate symposium : 287
- 3) 松井元子, 角田万里子, 三崎 旭 (1992) 第14回糖質シンポジウム講演要旨集 : 37
- 4) KAINUMA, K and D. FRENCH (1970) *FEBS Lett.*, **6** : 182
- 5) Nelson, N. (1944) *J. Biol. Chem.*, **153** : 375, SOMOGYI, M. (1952) *J. Biol. Chem.*, **195** : 19
- 6) KOIZUMI, K., Y., KUBOTA, T., TANIMOTO and Y., OKADA (1988) *J. Chromatogr.*, **454** : 303
- 7) KOIZUMI, K., Y., KUBOTA, T., TANIMOTO and Y., OKADA (1989) *J. Chromatogr.*, **464** : 365
- 8) UMEKI, K., and T., YAMAMOTO (1975) *J. Biochem.*, **78** : 897